



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Bacharelado em Agroecologia



LUANA CAROLINA DE FRANCO PETRÔNIO

ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO PARA CONTROLE DE *Alternaria*
alternata* (Fr:Fr.) Keissler f. sp. *citri

ARARAS – 2024



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Bacharelado em Agroecologia



LUANA CAROLINA DE FRANCO PETRÔNIO

**ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO PARA CONTROLE DE *Alternaria*
alternata (Fr:Fr.) Keissler f. sp. *citri***

Monografia apresentada ao Curso de
Bacharelado em Agroecologia – CCA – UFSCar
para a obtenção do título de Agroecólogo.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Patrícia Marluci da Conceição

ARARAS – 2024

**Dedico aos meus pais José Roberto e
Christiane, e ao meu irmão Álvaro.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC, por todo conhecimento, estrutura e oportunidades concedidas no período de graduação e estágio.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dra. Patrícia Marlucci da Conceição pela orientação durante todo o estágio, em trabalhos passados e nesta monografia.

Agradeço ao Dr. Fernando Alves de Azevedo, pesquisador do Centro de Citricultura Sylvio Moreira/IAC pela oportunidade e confiança depositada, além de todo o suporte que me proporcionou em todo o período de estágio.

Agradeço ao meu coorientador Me. Fernando Trevizan Devite, por todo o auxílio, conhecimentos e ensinamentos oferecidos ao longo do trabalho, sempre que precisei.

Agradeço ao GD Citros – Grupo de Desenvolvimento em Citros, em que pude iniciar meus estágios na graduação e fiz parte por quase 3 anos, por toda oportunidade de conhecimentos, pesquisas e bolsas de iniciações científicas.

Agradeço aos meus pais, José Roberto Monte e Christiane Aparecida de Franco Zeraik, ao meu irmão Álvaro Luiz de Franco Zeraik e a minha avó Nelma Maria Biruel de Franco, por todo apoio, conselhos e aprendizados, que auxiliaram neste momento fundamental da minha vida.

Agradeço ao meu noivo e parceiro de todos os momentos, Leonardo da Silva Guilmo, que me apoiou e incentivou todos os dias, oferecendo amor, lealdade e integridade durante a minha jornada.

Agradeço a República Lactá por toda parceria e irmandade durante meus anos de graduação, onde me proporcionou os melhores momentos, além de amigas para toda a vida, sendo minha segunda família.

Agradeço os meus amigos, especialmente a Sabrina dos Santos Campos e a Beatriz Saraiva Mariano, que fizeram toda a diferença nesse período.

**“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos.”**

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A preocupação com a resistência e a toxicidade dos fungicidas trouxe a necessidade de explorar alternativas para o controle da Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), causada pelo fungo *Alternaria alternata*. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dos óleos essenciais (OEs), em diferentes concentrações, no controle da MMA. O experimento 1, realizado *in vitro*, foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x4x5, sendo dois métodos de controle (preventivo e curativo), quatro genótipos de limão para extração de OE (Amber, Eureka, Harvey e Siciliano) e cinco concentrações de OE (0, 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$), com três repetições por concentração. No experimento 2, realizado *in vivo*, foi instalado em DIC, em esquema fatorial 2x4x3, com três repetições, sendo dois métodos de controle (preventivo e curativo), quatro genótipos de limão para extração de OE e três concentrações de OE (0, 8 e 16 L ml^{-1}). No método de controle preventivo aplicou-se aproximadamente 1 ml das diferentes concentrações da solução com OE + Tween 80 (1%), após duas horas foi aplicado 1ml da solução do patógeno. Para o teste de controle curativo, foi aplicado 1ml da solução do patógeno as folhas, e após 24h, foi aplicada a solução com OE + Tween 80. As avaliações de severidade foram realizadas durante sete dias após a inoculação do fungo. Utilizando os dados de severidade foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). Os dados foram submetidos à análise de variância, quando significativos para métodos de controle e genótipos de limão para extração de OE, foram comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Quando significativo para concentração foram analisados por regressão. O método de controle preventivo, no experimento *in vitro*, é melhor no controle do fungo *Alternaria alternata*. O genótipo Amber destacou-se no controle do fungo, tanto no método preventivo quanto no curativo. Os OEs dos quatro genótipos, nos dois métodos de aplicação, proporcionaram maior controle do fungo com o aumento da concentração dos OEs. No experimento *in vivo* não houve diferença entre os métodos de controle. Os OEs extraídos de todos os genótipos proporcionaram maior controle quando foi utilizada a maior concentração (16 $\mu\text{L ml}^{-1}$). O genótipo Amber apresentou o maior controle do fungo.

Palavras-chave: *Citrus limon*, d-limoneno, mancha marrom de alternaria

ABSTRACT

Concern about fungicide resistance and toxicity has led to the need to explore alternatives for controlling Alternaria Brown Spot (MMA), caused by the fungus *Alternaria alternata*. The objective of this work was to evaluate the effect of essential oils (EOs), in different concentrations, on the control of MMA. Experiment 1, carried out *in vitro*, was carried out in a completely randomized design (DIC), in a 2x4x5 factorial scheme, with two control methods (preventive and curative), four lemon genotypes for EO extraction (Amber, Eureka, Harvey and Siciliano) and five concentrations of EO (0, 2, 4, 8 and 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$), with three replicates per concentration. In experiment 2, carried out *in vivo*, it was installed in DIC, in a 2x4x3 factorial scheme, with three replications, two control methods (preventive and curative), four lemon genotypes for EO extraction and three EO concentrations (0, 8 and 16 L ml^{-1}). In the preventive control method, approximately 1 ml of different concentrations of the solution with EO + Tween 80 was applied, after two hours, 1 ml of the pathogen solution was applied. For the curative control test, 1ml of the pathogen solution was applied to the leaves, and after 24h, the solution with EO + Tween 80 was applied. Severity assessments were carried out for seven days after inoculation of the fungus. Using the severity data, the Area Below the Disease Progress Curve (AACPD) was calculated. The data were subjected to analysis of variance, when significant for control methods and lemon genotypes for EO extraction, they were compared using the Tukey test, at 5% probability. When significant for concentration, they were analyzed by regression. The preventive control method, in the *in vitro* experiment, is better in controlling the fungus *Alternaria alternata*. The Amber genotype stood out in controlling the fungus, both in preventive and curative methods. The EOs of the four genotypes, in both application methods, provided greater control of the fungus with increasing EO concentration. In the *in vivo* experiment there was no difference between the control methods. The EOs extracted from all genotypes provided greater control when the highest concentration was used (16 $\mu\text{L ml}^{-1}$). The Amber genotype showed the greatest control of the fungus.

Keywords: Citrus limon, d-limonene, alternaria brown spot.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Genótipos de limão, Limão Siciliano (A), Limão Eureka (B), Limão Harvey (C), Limão Amber (D). 18
- Figura 2.** Casca de limão picada (A), Aparelho tipo Moritz para destilação por arraste à vapor (B). 19
- Figura 3.** Folhas de tangor Murcott infectadas com MMA *in vitro* no controle curativo. (Fonte: Devite, 2021). 21
- Figura 4.** Aplicação da solução de OE + Tween 80 (1%), na face abaxial das folhas de Murcott (A), Folhas após a aplicação da solução de esporos (B), Ramos de tangor Murcott em câmara úmida (C), Sintomas de MMA em folhas de tangor Murcott (D). 22
- Figura 5.** Representação de escala diagramática de dez níveis para determinar a porcentagem de área foliar com sintoma da mancha marrom de alternária causada por *Alternaria alternata* (Fonte: Martelli et al., 2016). 23
- Figura 6.** Severidade do fungo *A. alternata* em diferentes concentrações de óleo essencial de diferentes genótipos, no controle Preventivo e Curativo – teste *in vitro* (Cordeirópolis, 2022). 25
- Figura 7.** Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) para controle Preventivo e Curativo - teste *in vitro*. 26
- Figura 8.** Severidade *in vivo* do fungo *A. alternata* em diferentes concentrações de óleo essencial de diversos genótipos (Cordeirópolis, 2024). 28
- Figura 9.** AACPD *in vivo* do fungo *A. alternata* em diferentes concentrações de óleo essencial de vários genótipos (Cordeirópolis, 2024). 28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Importância econômica de tangerinas no Brasil	11
2.2. Mancha Marrom de <i>Alternaria</i>	12
2.3. Limões	14
2.4. Óleo essencial de limão	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Extração dos óleos essenciais.....	18
4.2. Isolado do fungo <i>Alternaria alternata</i> e preparação do inóculo	19
4.3. Controle preventivo e curativo em folhas destacadas (<i>in vitro</i>).....	20
4.4. Controle preventivo e curativo no campo (<i>in vivo</i>)	21
4.5. Avaliações de Severidade e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)	23
4.6. Análise dos dados.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Controle preventivo e curativo em folhas destacadas (<i>in vitro</i>).....	24
5.2. Controle preventivo e curativo no campo (<i>in vivo</i>)	26
6. CONCLUSÃO	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de limas ácidas e limões, em 2022, foi de 21,5 milhões de toneladas, em 1,3 milhões de ha, sendo a Índia, México, China, Argentina e Brasil os principais produtores (FAOSTAT, 2024). No Brasil, no mesmo ano, a produção foi de aproximadamente 1,6 milhões de toneladas, numa área de 62,8 mil ha (FAO, 2024), sendo esses frutos destinados à industrialização e ao mercado de frutas frescas.

O interesse dos produtores de limão (*Citrus limon*) pelo mercado de frutas frescas vem aumentando, pois este apresenta um grande potencial, visto que o consumo dessa fruta *in natura* ainda é pequeno. Os frutos, não destinados ao consumo de frutas frescas, são encaminhados para a indústria onde serão produzidos sucos e/ou óleos essenciais (OEs). Os OEs possuem grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006; BAGETTA *et al.*, 2010).

Além das limas ácidas e dos limões verdadeiros, as tangerinas também são plantadas no Brasil. No entanto, assim como outros citros, a produção de tangerinas é caracterizada por uma seleção limitada de variedades, o que a torna vulnerável a problemas fitossanitários. Muitas doenças provocam sérios danos às tangerinas, com destaque para a mancha marrom de alternaria (MMA) causada pelo fungo *Alternaria alternata* pv. *citri* e o *Huanglongbing* (HLB), causado pela bactéria *Candidatus Liberibacter spp.* A incidência dessas doenças têm impactado significativamente os pomares, resultando em consideráveis prejuízos, dificultando a gestão e produção dessa cultura (BASSANEZI *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2010).

O fungo *A. alternata* produz uma toxina específica para o hospedeiro (HST – *Host-specific toxin*), sendo que a suscetibilidade a esta toxina está limitada às tangerinas e alguns de seus híbridos (AZEVEDO *et al.*, 2010). Os sintomas causados por esta toxina manifestam-se por meio de lesões necróticas em folhas novas, ramos e frutos, comprometendo a qualidade dos frutos para o consumo. Em casos de infecção intensa pode ocorrer desfolhamento durante os períodos de maior incidência da doença (TIMMER *et al.*, 2003).

Devido à suscetibilidade da maioria das variedades de tangerina à MMA, os produtores necessitam realizar diversas aplicações de fungicidas para seu controle, totalizando de 12 a 18 aplicações por ano, contribuindo para o aumento do custo de

produção (AZEVEDO *et al.*, 2010). Portanto, a preocupação em relação à resistência e à toxicidade dos fungicidas tem impulsionado a busca por alternativas no controle da doença, juntamente com os esforços no melhoramento genético das plantas.

Uma das alternativas para substituir o uso de produtos químicos é a utilização de OEs. Diversas pesquisas confirmam a eficácia dos OEs extraídos de plantas, os quais atuam como fungistáticos naturais ao inibir a atividade de fungos, sem deixar resíduos tóxicos para o homem (PEREIRA *et al.*, 2006; ARAÚJO NETO *et al.*, 2012). Esses óleos agem tanto por meio de sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto indireta, pela indução de fitoalexinas, sinalizando a presença de compostos com características de elicitores (SALGADO *et al.*, 2003; BRUM *et al.*, 2012; BIGATON *et al.*, 2013).

A extração dos OEs é geralmente realizada através do método de arraste a vapor, e em alguns casos, pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos. Flores, folhas, cascas, rizomas e frutos servem como matérias-primas para sua produção, exemplificadas pelos OEs de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente. (BIZZO *et al.*, 2009).

O interesse da comunidade científica nos OEs é devido às suas propriedades antimicrobianas (BAKKALI *et al.*, 2008). Portanto, este tipo de substância vegetal representa uma relevante alternativa no controle de microrganismos patogênicos. Dessa forma, os OEs surgem como uma opção ao tratamento químico convencional, no qual o uso de fungicidas sintéticos é um dos principais métodos para o controle de doenças em plantas, por vezes resultando na seleção de fungos fitopatogênicos resistentes (SILVA; FRANCISCO; BAPTISTELLA, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica de tangerinas no Brasil

O Brasil é um grande produtor de laranjas, tangerinas e seus híbridos, limas e limões, sendo a laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) a cultura cítrica predominante (REIS, 2022). No entanto, a produção de tangerinas tem ganhado destaque, elevando o país à posição de quinto maior produtor mundial, em 2022, com uma produção em torno de um milhão de toneladas (FAOSTAT, 2024). Produção consideravelmente menor que a da China, que em 2022, produziu 27 milhões de

toneladas, seguida da Turquia, que produziu 1,865 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2024).

Quando se trata dos principais estados produtores de tangerina do Brasil tem-se São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná (IBGE, 2022). A produção de tangerinas na região Sudeste corresponde a 61% do total nacional, totalizando cerca de 603 mil toneladas, cultivadas em mais de 25 mil hectares, no ano de 2019. A produtividade alcança 24 toneladas por hectare no Sudeste, é a mais elevada dentre todas as regiões do Brasil (LANDAU *et al.*, 2020).

Os levantamentos das safras e os dados econômicos indicam que a produção de tangerinas no Brasil diminuiu cerca de 12% desde 2011 (IBGE, 2021). O aumento de doenças, como a MMA tem prejudicado os pomares de tangerinas, resultando em consideráveis prejuízos e dificultando o manejo e a produção dessa cultura.

O tangor Murcott (*Citrus reticulata* Blanco × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e a tangerina Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) são importantes variedades cultivadas no estado de São Paulo, representando boa parte da produção de tangerinas e híbridos (CHIARINI *et al.*, 2017). O tangor Murcott é um híbrido que se originou nos Estados Unidos e foi introduzido no Brasil em 1948, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Desde então, este híbrido tem sido bem aceito pelos consumidores. Além de suas características qualitativas, o tangor Murcott apresenta resistência à leprose dos citros (*Citrus leprosis virus* - CiLV) e à clorose variegada dos citros (*Xylella fastidiosa*) (CENTRO DE CITRICULTURA SYLVIO MOREIRA, 2019; VEIGA *et al.*, 2019). Em relação à tangerina Ponkan, esta é cultivada mundialmente devido sua alta produtividade, além de agradar o paladar do consumidor. Apesar da tangerina Ponkan e do tangor Murcott serem amplamente cultivados, ambas variedades são suscetíveis à MMA (PIO *et al.*, 2006; AZEVEDO *et al.*, 2010).

2.2. Mancha Marrom de Alternaria

O agente responsável pela MMA é o fungo *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler f. sp. *citri*, inicialmente categorizado como *Alternaria citri*, devido à semelhança morfológica de suas estruturas com aquelas da espécie que provoca a podridão negra dos citros. Contudo, análises moleculares levaram à reclassificação do agente causador da MMA como *A. alternata* patótipo tangerina (STUART *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2015).

Dentro das espécies do seu gênero, a *A. alternata* se destaca por abrigar sete variantes patogênicas, conhecidas como patótipos ou *formae speciales*, as quais produzem toxinas hospedeiro-seletivas (*Host Selective Toxins - HSTs*), responsáveis por desencadear doenças em hospedeiros específicos (ITO et al., 2004). O patótipo de *A. alternata* que é patogênico à tangerina produz uma toxina seletiva ao hospedeiro conhecida como ACT (*Alternaria Citri Toxin*), sendo liberada pelo fungo nos primeiros estágios de infecção, afetando folhas, frutos e ramos (TARALLO, 2018). Esta toxina é a responsável pelos sintomas de manchas necróticas, podendo ou não apresentar um halo clorótico nos órgãos afetados. Além de ser tóxica para as tangerinas e seus híbridos, a toxina ACT também afeta toranjas e laranjas doces, mas não demonstra sintomas em limões (GAI et al., 2019).

Os esporos do fungo *A. alternata* têm capacidade de se dispersar facilmente pelo ar, sendo liberados em condições de chuva ou alta umidade relativa. Ao encontrar tecidos suscetíveis, como frutos, ramos e folhas jovens, os esporos germinam (TIMMER et al., 2003; STUART et al., 2009). Os primeiros sintomas nas folhas surgem entre 24 e 36 horas após a infecção, sendo pequenas manchas escuras, variando de tonalidade marrom a preta, podendo ou não apresentar um halo clorótico ao redor. Com o tempo essas manchas podem expandir-se e cobrir toda a superfície foliar (AZEVEDO et al., 2010). Os sintomas caracterizam-se por lesões necrosadas em ramos, frutos, tecidos verdes imaturos ou em fase de crescimento, podendo causar desfolhamento intenso durante os períodos de maior infecção devido a necrose das folhas. Quando se tem frutos maduros afetados pelos sintomas, estes acabam perdendo seu valor comercial para consumo *in natura* (TIMMER et al., 2003; STUART et al., 2009).

As brotações novas são altamente suscetíveis a MMA, e como são responsáveis pela floração subsequente, isso pode resultar em significativas perdas de produção no ano e da safra seguinte. Quando os sintomas surgem nas brotações novas, estas adquirem uma aparência semelhante à requeima. Por outro lado, quando surgem em ramos mais finos, as lesões são pequenas e corticosas. As condições propícias para a infecção do material vegetal afetado ocorrem com temperaturas entre 20 a 27°C e em torno de 10 a 12 horas de molhamento foliar contínuo (TIMMER et al., 2003).

A MMA representa um desafio quanto ao seu controle, pois o fungo possui uma alta capacidade de disseminação e está amplamente presente nas principais regiões

citrícolas do Brasil, onde encontra condições extremamente propícias para proliferar (MARTELLI, 2011; AZEVEDO *et al.*, 2019). O manejo da doença no campo requer aplicações frequentes de fungicidas, resultando em um aumento significativo nos custos de produção. Isso tem impactado os produtores de tangerinas, muitas vezes levando-os a considerar a possibilidade de descontinuar seus pomares (AZEVEDO *et al.*, 2010).

O controle da MMA deve ser preventivo e empregar uma combinação de práticas culturais integradas, utilizando diversas ferramentas e manejos, fomentando a sustentabilidade da produção (BHATIA *et al.*, 2003; TIMMER *et al.*, 2003; MILANEZE, 2013). Entre as práticas culturais que contribuem para o controle estão: a realização de podas de limpeza (remoção de galhos ou ramos secos, doentes ou improdutivos); o aumento de espaçamento entre as plantas; a eliminação de restos culturais; redução de aplicações pulverizadas (finalidade de evitar a disseminação do conídio e tempo de molhamento superficial) e evitar excesso de adubações nitrogenadas que favoreçam a brotação excessiva das plantas. (SWART *et al.*, 1998; VEGA e DEWDNEY, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016).

2.3. Limões

A origem do limão [*Citrus limon* (L.) Burm. f.] ainda é muito debatida, no entanto, a hipótese mais aceita sugere que seja um híbrido originário da Índia. Sua entrada na Europa ocorreu no século XI, durante as Cruzadas, e sua introdução no Continente Americano ocorreu durante as Grandes Navegações, especialmente com a chegada de Cristóvão Colombo às Américas, em 1492 (PIO *et al.*, 2005).

A análise dos números referentes à produção e comercialização de limão é desafiadora, dada a inclusão das limas ácidas Tahiti (*Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka) e Galego (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle) na categoria de "limões". No entanto, estima-se que, globalmente, 70% da produção seja de limão, enquanto o restante compreende limas ácidas. No Brasil, a situação é antagônica, sendo a produção de limas ácidas muito mais expressiva que a de limões (AMARO *et al.*, 2003).

O limoeiro é uma planta com hábito de crescimento ereto e bastante vigoroso, suas folhas apresentam formato oval e coloração verde clara, os ramos possuem espinhos de diversos tamanhos e as flores de coloração roxo purpúreo (FERREIRA *et al.*, 2018). Um dos principais genótipos de limão cultivado é o Siciliano. Este é o

mais plantado tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, apresenta frutos de tamanho médio, baixa quantidade de sementes e elevado teor de suco, sendo muito valorizado no mercado de frutas frescas (PIO *et al.*, 2005).

O limão tem diversas aplicações e aproveitamentos, os frutos de alta qualidade são destinados ao consumo no mercado de frutas frescas, enquanto aqueles que não atendem a esses critérios são direcionados para a produção de suco concentrado, OEs e pectina (LANDA, 2014). Grande parte do limão produzido no Brasil é destinado ao mercado interno, sendo utilizado principalmente pela indústria de refrigerantes, enquanto uma pequena fração é direcionada para o consumo *in natura* (AMARO & MAIA, 1997).

A fim de garantir uma boa comercialização de frutas *in natura*, é primordial que o material atenda a requisitos de qualidade físico-química. Esses critérios incluem a coloração e aspecto externo da casca, tamanho apropriado, espessura adequada da casca, equilíbrio adequado de acidez e sólidos solúveis no suco, aroma agradável, baixa presença de sementes, boa capacidade de conservação e resistência ao transporte (PIO, 1992).

2.4. Óleo essencial de limão

O termo “óleo essencial” tem sua origem no termo "*Quinta essentia*", que surgiu no século XVI pelo reformador da medicina Paracelsus Von Hohenheim para se referir a essa substância (BURT, 2004). Geralmente são obtidos por processos de vapor ou hidrodestilação, inicialmente desenvolvidos pelos árabes na Idade Média. Esses óleos são conhecidos devido suas propriedades antissépticas, abrangendo ação bactericida e fungicida, bem como por suas aplicações medicinais e fragrâncias distintas (BAKKALI *et al.*, 2008).

O emprego de fungicidas sintéticos representa um dos principais meios de controle de doenças em plantas. No entanto, a utilização frequente desses produtos, com o mesmo princípio ativo, pode resultar na seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, levando à redução da eficácia do fungicida (SILVA *et al.*, 2008). Nesse contexto, uma alternativa favorável em comparação ao tratamento químico convencional é a aplicação de produtos naturais (GOMES, 2011). Diversas pesquisas com OEs obtidos de plantas mostram que estes atuam como fungicidas naturais, inibindo a atividade de fungos sem deixar resíduos nocivos para os seres humanos

ou os alimentos tratados (PEREIRA *et al.*, 2006; ARAÚJO NETO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013).

OEs são complexas misturas de substâncias lipofílicas voláteis, geralmente líquidas e com aroma, extraídas de matérias-primas vegetais. Sua denominação provém das propriedades físico-químicas, sendo a volatilidade a característica primordial que os diferencia de outros tipos de óleos, tornando-os solúveis em solventes orgânicos apolares. Sua composição abrange uma ampla variedade de classes de compostos, incluindo hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas. De modo geral, os OEs são instáveis, principalmente quando expostos à luz, calor, umidade, ar e metais (SIMÕES *et al.*, 2007)

A produção de OEs não é determinada apenas por fatores genéticos ou pela fase de desenvolvimento das plantas, mas também por uma série de elementos ambientais que afetam as alterações bioquímicas e fisiológicas. Essas modificações resultam em variações na quantidade e na composição do OE, o que por sua vez influencia e pode prejudicar o aroma produzido pela planta (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Nos OEs de citros, em geral, o D-limoneno é o mais expressivo componente dos óleos, atingindo concentrações de 70 a 96%. Os dois enantiômeros do limoneno são os mais abundantes monoterpenos na natureza. S-(-)-limoneno é principalmente encontrado numa variedade de plantas e ervas como *Mentha spp.*, enquanto R-(+)-limoneno é o componente principal dos óleos das cascas de limão e laranja, possuindo funções naturais como a prevenção da desidratação e a inibição de crescimento microbiano nos vegetais. (DEMYTTENAERE *et al.* 2004; LADANIYA, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito dos OEs, extraídos de casca de genótipos de limão, em diferentes concentrações, no controle da MMA, causada pelo fungo *Alternaria alternata*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito dos OEs extraídos de casca de genótipos de limão, no controle preventivo e curativo do fungo (*A. alternata*) em folhas destacadas de tangor Murcott IAC 221;

Avaliar o efeito dos OEs extraídos de casca de genótipos no controle preventivo e curativo do fungo (*A. alternata*), no campo, em plantas de tangor Murcott IAC 221.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Uma Coleção de Trabalho de Citros foi estabelecida em 2015/2016 em uma área total de 29 hectares. Nessa área, 720 diferentes acessos foram implantados, contendo representantes de diferentes grupos hortícolas (tangerinas, clementinas, tangores, laranjas, limas doces, limas ácidas, limão e diferentes grupos de porta-enxertos) enxertados em limão Cravo.

Os genótipos estão em ensaio instalado no Centro de Citricultura Sylvio Moreira do Instituto Agrônomo (IAC) em Cordeirópolis-SP, nas coordenadas geográficas: 22° 32' de latitude sul e 47° 27' de longitude-oeste, altitude de 639 m, clima do tipo Cwa, de acordo com o sistema internacional de Köppen, e com solo classificado como Latossolo Vermelho Escuro-Distrófico, textura argilosa. Dessa coleção selecionou-se para este trabalho quatro genótipos de limão: Siciliano (Figura 1 A); Eureka (Figura 1B); Harvey (Figura 1C) e Amber (Figura 1D).

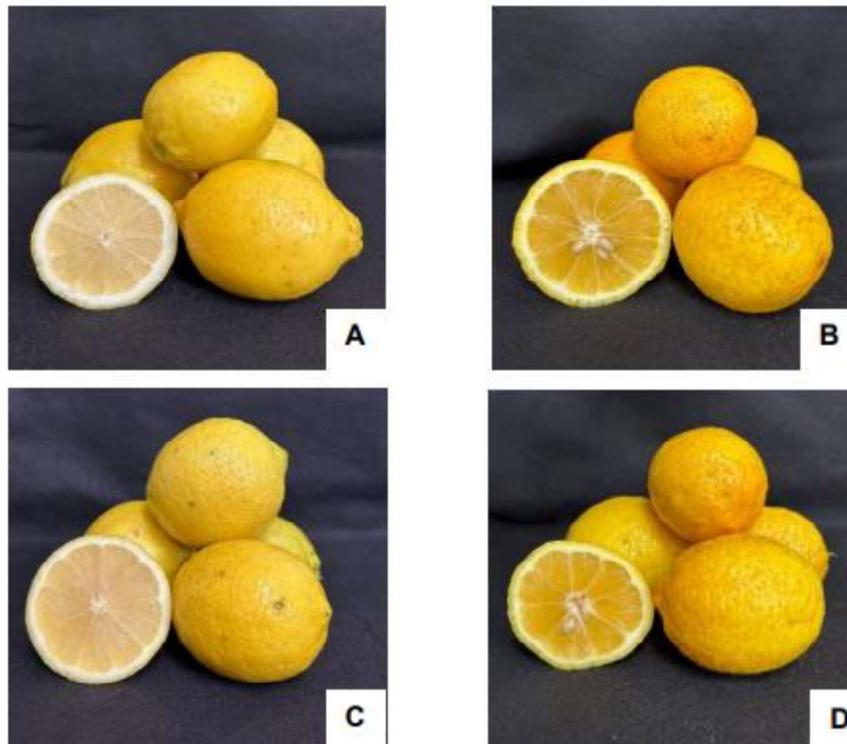


Figura 1. Genótipos de limão, Limão Siciliano (A), Limão Eureka (B), Limão Harvey (C), Limão Amber (D).

4.1. Extração dos óleos essenciais

Para extração dos OEs foram coletados 80 frutos de cada genótipo. Esses foram lavados, higienizados e posteriormente descascados, mantendo o albedo na casca. As cascas foram cortadas manualmente em pedaços de aproximadamente 1 cm² (Figura 2 A). Os OEs foram extraídos através do processo de hidrodestilação por arraste a vapor, utilizando-se o aparelho tipo Moritz (Figura 2 B), com aproximadamente 300 gramas de cascas por extração, durante um período de 3 horas (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Os OEs foram coletados e armazenados em frascos âmbar (protegidos da luz), à 4 °C.

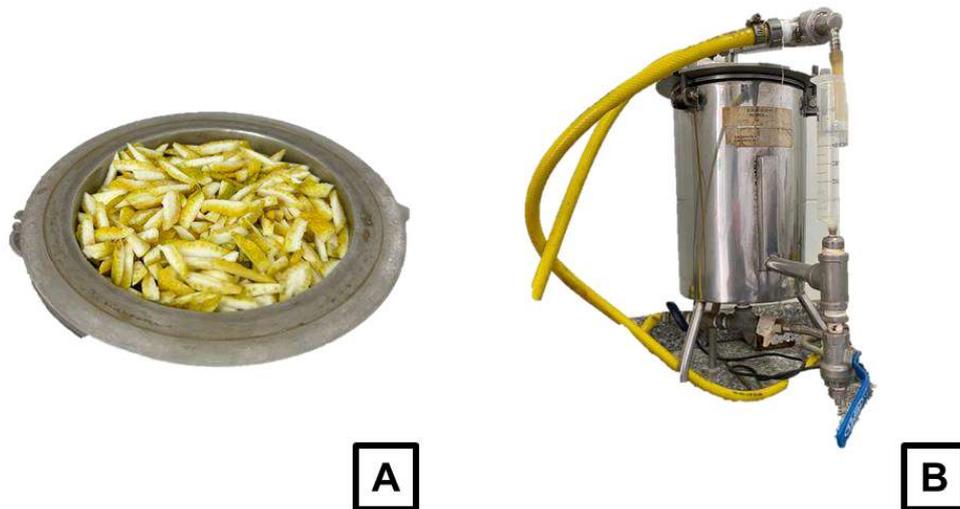


Figura 2. Casca de limão picada (A), Aparelho tipo Moritz para destilação por arraste à vapor (B).

4.2. Isolado do fungo *Alternaria alternata* e preparação do inóculo

O isolado de *A. alternata* foi obtido a partir de lesões típicas da doença em frutos de tangor Murcott, variedade altamente suscetível. Para obtenção do isolado foi utilizada a metodologia descrita por PEEVER *et al.* (1999) com modificações AZEVEDO *et al.* (2010). As lesões foram retiradas dos frutos e desinfestadas com etanol 70%, hipoclorito 3% e água destilada, sendo incubadas, em seguida, em placas de Petri contendo meio BDA (200g batata, 20g de dextrose e 14g ágar L⁻¹). Nas placas foi acrescentado o fungicida carbendazin (640 mg L⁻¹), o qual não possui efeito sobre o patógeno, apenas a outros fungos oportunistas. As placas foram mantidas em BOD, com fotoperíodo de 12 horas, a aproximadamente 27°C, durante 48 horas.

Após as 48 horas, foram identificadas nas placas, com o auxílio de um microscópio óptico, hifas características do patógeno, em seguida realizou-se a dissolução em série com água destilada até a concentração de 10¹ conídios ml⁻¹ para a obtenção do isolado monospórico. A solução do isolado monospórico foi transferida para outras placas de Petri contendo meio BDA.

O preparo do inóculo foi realizado através da transferência de discos invertidos de micélio do fungo (8 mm de diâmetro) para a placa de Petri contendo a mesma condição do isolado, sendo mantidas em BOD durante sete dias, com fotoperíodo de

12 horas, a aproximadamente 27°C, conforme metodologia de CANIHOS *et al.* (1999). Após o crescimento micelial foram adicionados 10 ml de água destilada na superfície da placa, e com o auxílio de uma alça de drigalski esterilizada foram retirados os conídios da superfície da placa. A suspensão foi filtrada em uma camada de gaze esterilizada para a retirada de fragmentos miceliais advindos da placa, e em seguida ajustada a concentração para 10⁵ conídios ml⁻¹, com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.3. Controle preventivo e curativo em folhas destacadas (*in vitro*)

A partir de testes de inibição de crescimento micelial realizado *in vitro* (dados não apresentados) (DEVITE, 2021), foram estipuladas as concentrações dos OEs dos quatro genótipos de limão, sendo: 0 (testemunha), 2, 4, 8 e 16 µL ml⁻¹ do OE junto com Tween 80 na proporção de 1% do volume do meio, e a testemunha com apenas água destilada. Em tubos de ensaio estéreis foram adicionadas solução de água e Tween 80, acrescentando a alíquota de OE para obtenção da concentração desejada, em seguida, foi agitado até completa homogeneização.

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4x5, sendo dois métodos de controle (preventivo e curativo), quatro genótipos de limão para extração de OE (Amber, Eureka, Harvey e Siciliano) e cinco concentrações de OE (0, 2, 4, 8 e 16 µL ml⁻¹), com três repetições por concentração, sendo cada repetição composta por uma placa de Petri composta por três folhas jovens de tangor Murcott.

As plantas de tangor Murcott, mantidas em estufa, tinham 12 meses de idade e estavam enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osbeck). Quinze dias antes da coleta foi realizada uma poda no topo das plantas, com o objetivo de estimular novas brotações. As folhas novas destacadas das plantas tinham cerca de 2-4 cm de comprimento. Após coletadas, as folhas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em placas de Petri, contendo uma camada de papel de filtro e uma pequena porção de algodão umedecido para manter a umidade na placa.

O teste de controle preventivo foi instalado aplicando-se com uma pipeta automática, 1 ml das diferentes concentrações da solução com óleo essencial + Tween 80 na face abaxial das folhas. Duas horas após, quando as folhas estavam secas, foi borrifado 1 ml da solução de 10⁵ conídios.ml⁻¹ do patógeno (obtido conforme o item 4.2) e em seguida mantidas em BOD a aproximadamente 27°C± 2°C com

fotoperíodo de 12 horas. Para o teste de controle curativo, as folhas foram inoculadas com a solução de fungos e mantidas 24h em BOD. Após 24h, foi aplicada as soluções com óleo essencial + Tween 80 (Figura 3). As avaliações de severidade ocorreram por sete dias consecutivos.



Figura 3. Folhas de tangor Murcott infectadas com MMA *in vitro* no controle curativo. (Fonte: Devite, 2021).

4.4. Controle preventivo e curativo no campo (*in vivo*)

Foram utilizadas plantas de tangor Murcott, enxertadas em limão Cravo, com dois anos de idade, localizadas na Quadra 6 da coleção de trabalho do Centro de Citricultura Sylvio Moreira. Foram selecionados ramos que apresentavam folhas novas, com aproximadamente 2-4 cm de comprimento, localizadas no terço superior das plantas. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4x3, com três repetições, sendo dois métodos de controle (preventivo e curativo), quatro genótipos de limão para extração de óleo essencial (Amber, Eureka, Harvey e Siciliano) e três concentrações de óleo essencial (0, 8 e 16 L ml⁻¹), as quais foram selecionadas a partir dos resultados obtidos no experimento *in vitro* em folha destacada. Cada repetição foi composta por uma planta de tangor Murcott, sendo avaliadas quatro folhas de três ramos diferentes da mesma planta.

O teste de controle preventivo foi instalado aplicando-se com um borrifador, aproximadamente 1 ml das diferentes concentrações da solução com OE + Tween 80 (1%), na face abaxial das folhas (Figura 4A). Após duas horas da aplicação da solução

foi aplicado 1ml da solução de 10^6 conídios.ml⁻¹ do patógeno (Figura 4B). Para o teste de controle curativo, as folhas foram inoculadas, e após 24h, foi aplicada a solução com OE + Tween 80. Para ambos os métodos de controle, após a inoculação do patógeno, os ramos foram mantidos em câmara úmida para que se tenha as condições de umidade necessárias para a infecção do fungo. Para isso, os tratamentos foram cobertos com um saco plástico transparente (12 x 20 cm), preso com fita adesiva para manter a umidade (Figura 4C). Após a montagem do experimento, foi avaliado durante sete dias a severidade dos sintomas na folha (Figura 4D).

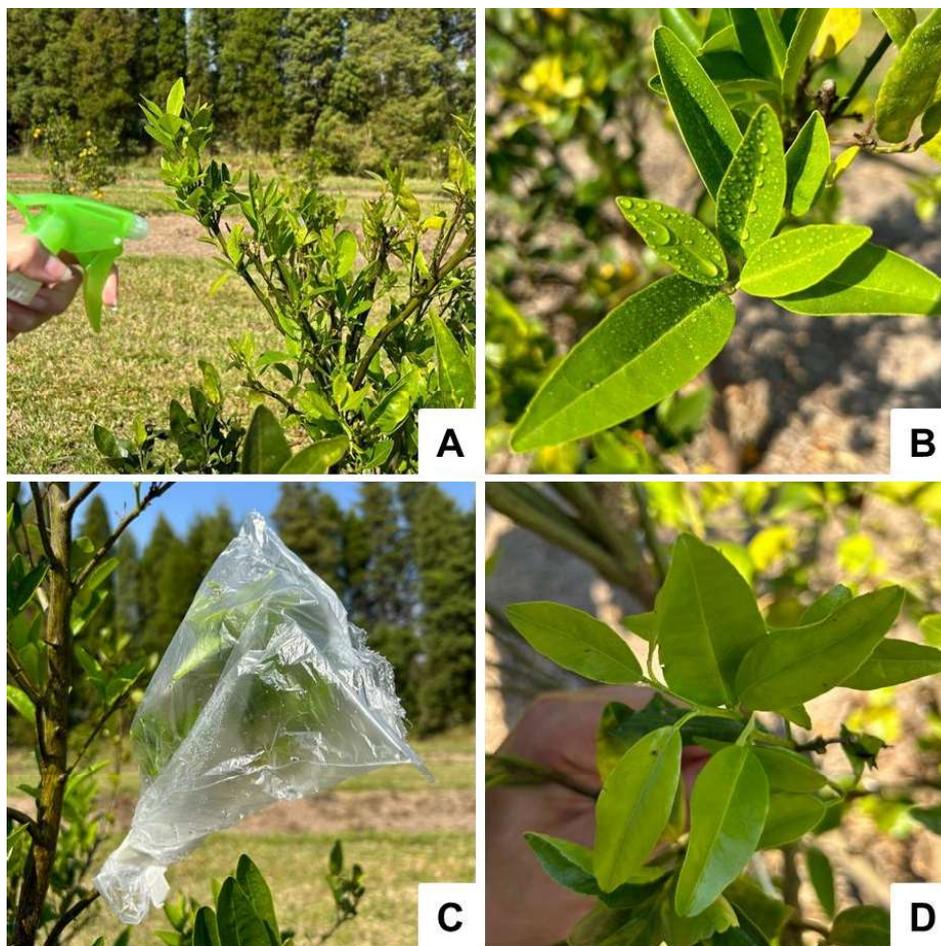


Figura 4. Aplicação da solução de OE + Tween 80 (1%), na face abaxial das folhas de Murcott (A), Folhas após a aplicação da solução de esporos (B), Ramos de tangor Murcott em câmara úmida (C), Sintomas de MMA em folhas de tangor Murcott (D).

4.5. Avaliações de Severidade e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD)

As avaliações das lesões (*in vitro* e *in vivo*), ocasionadas pelo fungo *A. alternata*, ocorreram através da observação da presença de sintomas típicos da doença. Posteriormente, foram realizadas determinações da área lesionada conforme descrito por MARTELLI *et al.* (2016), representando os níveis de sintomas em dez notas ilustradas, onde “0” representa folha sem sintomas, e as notas de severidade: 0,3; 3,5; 8; 15; 34; 61; 80; 90 e 97 por cento de área foliar sintomática (Figura 5).

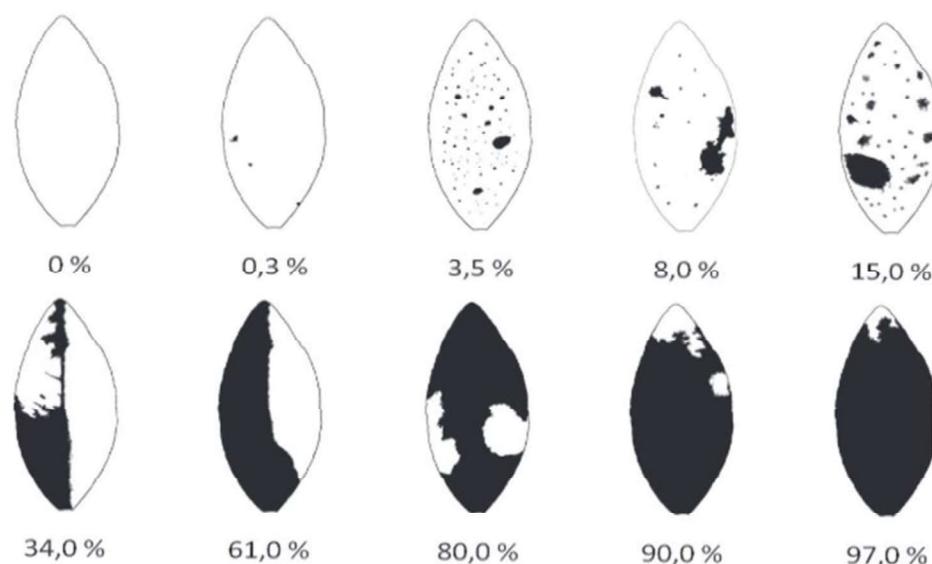


Figura 5. Representação de escala diagramática de dez níveis para determinar a porcentagem de área foliar com sintoma da mancha marrom de alternária causada por *Alternaria alternata* (Fonte: MARTELLI *et al.*, 2016).

Utilizando os dados de severidade, foi calculada a AACPD que é expressa pela plotagem da proporção de doença. Calculada pela fórmula de Shaner e Finney (1977): $AACPD = \sum_{n-1} [(Y_{i+1} + Y_i)/2] * [(T_{i+1} - T_i)]$; onde:

n – é o número de observações/avaliações;

Y_i – proporção da doença na “i”-ésima observação/avaliação;

T_i – é o tempo em dias na “i”-ésima observação/avaliação.

4.6. Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, quando significativos para métodos de controle e genótipos de limão para extração de OE, foram comparados

pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Quando significativo para concentração foram analisados por regressão.

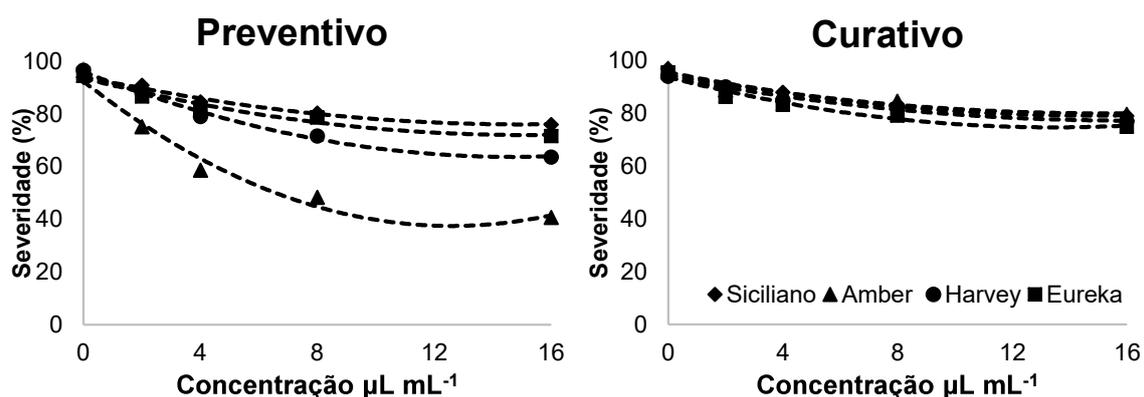
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Controle preventivo e curativo em folhas destacadas (*in vitro*)

No método de controle preventivo, o OE extraído do genótipo Amber proporcionou menor severidade da MMA nas folhas nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$, comparado aos demais genótipos (Figura 6). O OE do genótipo Amber proporcionou menor severidade nas folhas no método preventivo em relação ao curativo, nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 6). No controle preventivo e curativo a severidade do fungo *A. alternata* diminuiu à medida que a concentração dos OEs aumentou (Figura 6). Os resultados deste trabalho corroboram com os obtidos por Moura et al. (2022) que avaliaram o efeito curativo e preventivo dos OE de laranja doce (*Citrus vulgaris*) e limão siciliano no controle da antracnose em frutos de banana e pimentão nas concentrações de 0,05 e 0,1% (10 μL). Os autores observaram que maiores concentrações de OEs (1%) no método curativo, foram mais eficientes no controle dos patógenos *Colletotrichum musae* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

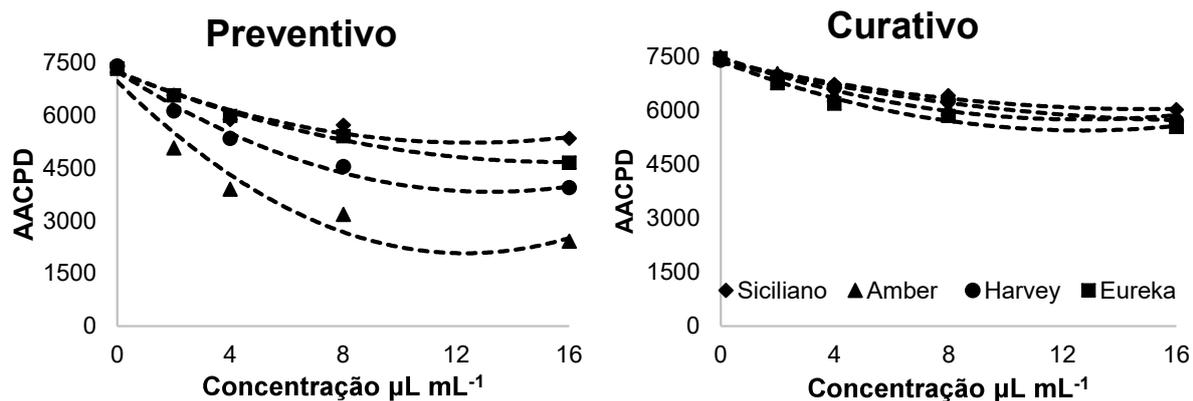
No método preventivo, o genótipo Amber exibiu os menores valores de AACPD nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 7). O genótipo Amber apresentou menor AACPD no método preventivo em todas as concentrações, em relação ao método curativo (Figura 7). Os OEs dos quatro genótipos, nos dois métodos de aplicação, proporcionaram menor AACPD com o aumento da concentração dos OEs (Figura 7). Esses dados corroboram com Devite et al. (2021) que avaliaram os efeitos inibitórios dos OEs, pelos métodos preventivo e curativo, em diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$). O OE da tangerina IAC 2019 Maria apresentou maior inibição do crescimento do fungo, no método de controle preventivo e curativo, na concentração de 16 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Destaca-se que a efetividade dos efeitos dos OEs requer o uso em concentrações que podem variar conforme o patógeno alvo e a cultura avaliada. O impacto antifúngico dos OEs também está relacionado à composição química única de cada um, influenciando direta ou indiretamente a atividade biológica e a sensibilidade dos microrganismos aos OEs. (ANTUNES; CAVACO, 2010).



Óleo essencial	Equação	R ²
Amber (Preventivo)	$y = 0,3316x^2 - 8,080x + 88,289$	0,90
Eureka (Preventivo)	$y = 0,0860x^2 - 2,685x + 92,932$	0,96
Harvey (Preventivo)	$y = 0,1310x^2 - 4,024x + 94,638$	0,99
Siciliano (Preventivo)	$y = 0,0815x^2 - 2,447x + 94,314$	0,98
Amber (Curativo)	$y = 0,0643x^2 - 1,940x + 94,557$	0,97
Eureka (Curativo)	$y = 0,1059x^2 - 2,849x + 93,756$	0,95
Harvey (Curativo)	$y = 0,0637x^2 - 2,048x + 93,631$	0,97
Siciliano (Curativo)	$y = 0,0768x^2 - 2,258x + 95,661$	0,96

Figura 6. Severidade do fungo *A. alternata* em folhas destacadas em diferentes concentrações de óleo essencial de diferentes genótipos, no controle Preventivo e Curativo – teste *in vitro* (Cordeirópolis, 2022).



Óleo essencial	Equação	R ²
Amber (Preventivo)	$y = 10,425x^2 - 328,00x + 7246,9$	0,99
Eureka (Preventivo)	$y = 32,226x^2 - 794,43x + 6965,8$	0,94
Harvey (Preventivo)	$y = 19,616x^2 - 518,86x + 7250,1$	0,98
Siciliano (Preventivo)	$y = 13,005x^2 - 324,74x + 7243,2$	0,93
Amber (Curativo)	$y = 10,789x^2 - 273,28x + 7478,9$	0,98
Eureka (Curativo)	$y = 11,884x^2 - 302,86x + 7364,7$	0,97
Harvey (Curativo)	$y = 4,9667x^2 - 180,87x + 7340,3$	0,99
Siciliano (Curativo)	$y = 5,8777x^2 - 177,59x + 7377,5$	0,97

Figura 7. Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) para controle Preventivo e Curativo - teste *in vitro*.

5.2. Controle preventivo e curativo no campo (*in vivo*)

No experimento *in vivo* não houve diferença entre os métodos de controle para as avaliações de severidade e AACPD (dados não demonstrados). Esse resultado indica, que em condições de campo, o momento da aplicação do OE (preventivo x curativo) não influenciou o controle da doença.

Os OEs extraídos de todos os genótipos proporcionaram menor severidade quando foi utilizada a maior concentração ($16\mu\text{L mL}^{-1}$) (Figura 8). Esses resultados corroboram com TUNDIS *et al.* (2012) e PIRES e PICCOLI (2012), onde os OEs do gênero Citrus também indicaram eficiência na inibição de crescimento do patógeno

nas maiores concentrações, mostrando a efetividade de OEs deste gênero como agente microbiano.

Nas concentrações de 8 e 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$, o OE extraído do genótipo Amber apresentou maior controle do fungo. As folhas tratadas com OE extraído do genótipo Eureka, nas concentrações de 8 e 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$, apresentaram menor severidade quando comparado ao tratamento com OE extraído do Harvey e Siciliano (Figura 8).

Para todos os genótipos a AACPD foi inferior nas concentrações 8 e 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$, em relação a testemunha (0 $\mu\text{L ml}^{-1}$) (Figura 9). Nas concentrações 8 e 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$, o OE extraído do genótipo Amber proporcionou menor AACPD, conseqüentemente menor crescimento do fungo *A. alternata* ao longo dos sete dias de avaliação, quando comparado aos demais genótipos. Na concentração 16 $\mu\text{L ml}^{-1}$, o genótipo Harvey, apresentou menor AACPD, quando comparado ao Eureka e Siciliano (Figura 9). A efetividade dos óleos variou entre os genótipos de onde foram extraídos. A composição química de cada OE pode influenciar sua eficácia.

A capacidade lipofílica dos fitos componentes presentes nos OEs permite a penetração na membrana dos fungos, ocasionando em danos na integridade da membrana celular (JING et al., 2018). Essa ação dos OEs extraídos dos citros é devido à ação sinérgica de todos os componentes. Segundo RAMMANEE e HONGPATTARAKERE (2011), compostos como limoneno puro, citronelal e citronelol foram 5 a 6 vezes menos eficazes como fungicidas do que os OEs naturais, indicando a atividade sinérgica de muitos compostos ativos presentes em OEs. Como os OEs extraídos de diferentes genótipos têm proporções diferentes de cada componente, esse efeito sinérgico é variável.

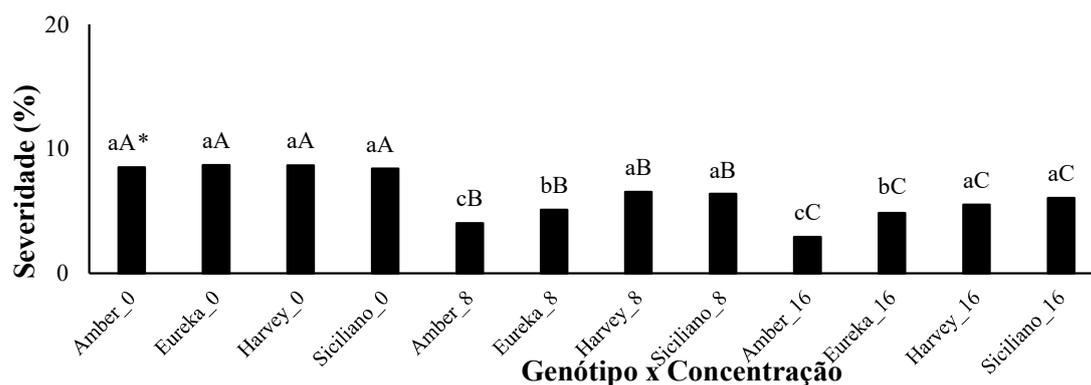


Figura 8. Severidade *in vivo* do fungo *A. alternata* em diferentes concentrações de óleo essencial de diversos genótipos (Cordeirópolis, 2024).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre genótipos na mesma dose e letras maiúsculas dentro do mesmo genótipo em doses diferentes não diferem significativamente (Tukey, 5%).

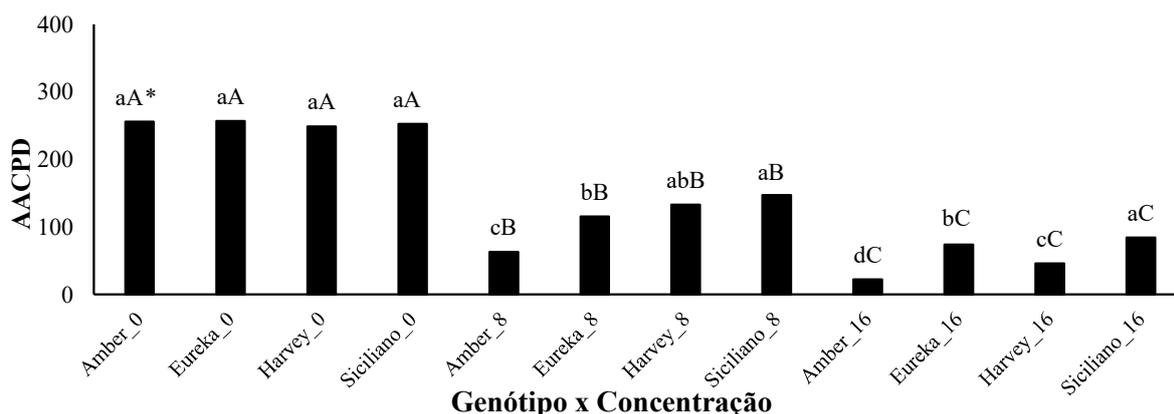


Figura 9. AACPD *in vivo* do fungo *A. alternata* em diferentes concentrações de óleo essencial de vários genótipos (Cordeirópolis, 2024).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre genótipos na mesma dose e letras maiúsculas dentro do mesmo genótipo em doses diferentes não diferem significativamente (Tukey, 5%).

6. CONCLUSÃO

O método de controle preventivo, no experimento *in vitro*, é melhor no controle do fungo *Alternaria alternata*. O genótipo Amber destacou-se no controle do fungo, tanto no método preventivo quanto no curativo. Os OEs dos quatro genótipos, nos dois métodos de aplicação, proporcionaram maior controle do fungo com o aumento da concentração dos OEs.

No experimento *in vivo* não houve diferença entre os métodos de controle. Os OEs extraídos de todos os genótipos proporcionaram maior controle quando foi utilizada a maior concentração ($16\mu\text{L ml}^{-1}$). O genótipo Amber apresentou o maior controle do fungo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARO, A. A.; MAIA, M. L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **INFORMACOES ECONOMICAS-GOVERNO DO ESTADO DE SAO PAULO INSTITUTO DE ECONOMIA AGRICOLA**, v. 27, p. 11-26, 1997.

AMARO, A. A.; CASER, D. V.; NEGRI, J. D. Tendências na produção e comércio de limão. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 4, p. 37-47, 2003.

ANTUNES, M. D.; CAVACO, A. M. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Local de Publicação, v. 48, n. 12, p. 3418–3423, 2010.

ARAUJO NETO, A. C. A. *et al.* Óleo essencial de anis na incidência e controle de patógenos em sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare Mill.*). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 7, n. 1, p. 170-176, 2012.

AZEVEDO, F. A. *et al.* Resposta de diferentes genótipos de tangerinas e seus híbridos à inoculação in vitro e in vivo de *Alternaria alternata*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cordeirópolis, v. 32, n. 3, p.1-10, set. 2010.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Tétouan, v. 46, n. 2, p. 446-475, feb. 2008.

BASSANEZI R.B. *et al.* DOENÇAS DOS CITROS. IN: AMORIM L, REZENDE J.A.M., BERGAMIM FILHO A, CAMARGO LEA, eds. **Manual de Fitopatologia**. Ouro Fino: Ceres, p. 292–293, 2016.

BAGETTA, G. *et al.* Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, Calabria, v. 81, n. 6, p. 453-61, 2010.

BHATIA, A., ROBERTS, P.D., AND TIMMER, L.W. Evaluation of the Alter-Rater model for timing of fungicide applications for control of *Alternaria* brown spot of citrus. *Plant Disease*, v.87, p.1089-1093, 2003.

BIGATON, D., BACCHI, L. M. A., FORMAGIO, A. S. N., GAVASSONI, W. L., ZANELLA, C. S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 757-763, 2013.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BRUM, S R. B C. Efeito de óleos essenciais no controle de fungos fitopatogênicos.2012. 135 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Campus Universitário de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 23-253, 2004.

CANIHOS; PEEVER, T.L., TIMMER, L.W. Temperature, leaf wetness, and isolate effects on infection of *Minneola* tangelo leaves by *Alternaria* spp. *Plant Disease*, v.83, p.429- 433, 1999.

CHIARINI, A. Risk-based thinking according to ISO 9001: 2015 standard and the risk sources European manufacturing SMEs intend to manage. **The TQM Journal**, v. 29, n. 2, p. 310-323, 2017.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. And *Penicillium* sp. and the use of solid phase microextraction for screening. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 1027, n. 1-2, p. 137-146, 2004.

DEVITE, F. T. **Métodos alternativos para o controle da mancha marrom de alternária: nutrição e óleos essenciais de citros**. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2021.

FERREIRA, R. V. et al. Desenvolvimento vegetativo e características físico-químicas dos frutos de quatorze genótipos de limão. **Citrus Research & Technology**, v. 39, p. 1-9, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT: Production**. Rome: FAO, 2024. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

GAI, Y. *et al.* The methionine biosynthesis regulator AaMetR contributes to oxidative stress tolerance and virulence in *Alternaria alternata*. **Microbiological research**, v. 219, p. 94-109, 2019.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Revista Química Nova*, ed.30, p.374 -381, 2007.

GOMES, M. S. Caracterização química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Citrus*. 98 f. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

HUANG, Feng et al. Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. **Fungal biology**, v. 119, n. 5, p. 320-330, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção agrícola mundial. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovoportaleco>. Rio de Janeiro. Acesso em: 1 jun de 2024.

ITO, K., *et al.* Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. *Molecular Microbiology*, v. 52, p.399-411, 2004.

JING, C. *et al.* Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Crop Protection**, v. 104, p. 41-46, 2018.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit biology, technology and evaluation**. 1 st ed. San Diego: Academic Press, p.558, 2008.

LANDA, R. I. Análisis de la producción y comercialización del limón en Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina, Buenos Aires, 2014

LANDAU, E. C. *et al.* Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas: cenário histórico, divisão política, características demográficas, socioeconômicas e ambientais. Brasília, DF: Embrapa, 2020. v. 1, cap. 39, p. 1273-1300, 2020.

MARTELLI, I.B. Manejo de mancha marrom de alternaria em citros: poda de limpeza e correlação com lagarta minadora. Campinas – SP. 41fls. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, IAC, 2011.

MARTELLI, I. B. *et al.* Diagrammatic scale for assessing foliar symptoms of alternaria brown spot in citrus. **Agronomy Science and Biotechnology**, Cordeirópolis, v. 2, n. 2, p. 57-61, 2016.

MILANEZE, T.F. Poda e calda sulfocálcica para o controle da mancha marrom de alternaria em tangor Murcott. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto Agronômico de Campinas, IAC, 2013.

MOURA, G. S. *et al.* Efeito de óleos essenciais de *Citrus* spp. no controle pós-colheita da antracnose em banana e pimentão. **Revista Cultivando o Saber**, Maringá, v. 10, n. 3, p. 354 - 369, 2022.

PEEVER, T. L. *et al.* Population genetic structure and host specificity of *Alternaria* spp. causing brown spot of Minneola tangelo and rough lemon in Florida. **Phytopathology**, Washington, v. 89, n. 10, p. 851–860, oct. 1999.

PEREIRA, M. C. *et al.* Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n.4, p.731-738, 2006.

PIRES, T. C.; PICCOLI, R. H. Efeito inibitório de óleos essenciais do gênero Citrus sobre o crescimento de micro-organismos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, Lavras, v. 71, n. 2, p. 259-65, 2012.

PIO, R. M. Caracterização e avaliação de frutos de oito variedades do grupo das tangerinas. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

PIO, R. M. *et al.* Características da variedade Fremont quando comparadas com as das tangerinas' Ponkan'e'Clementina Nules'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 222-226, 2006.

PIO, R. M. *et al.* Variedades Copa. In D. Mattos Junior, J. D. Negri, R. M. Pio, & J. Pompeu Junior (Eds.), Citros (cap. 3, pp. 37-60). Campinas: Instituto Agrônomo, Fundag, 2005.

RAMMANEE, Kadsarin; HONGPATTARAKERE, Tipparat. Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1050-1059, 2011.

REIS, A. C. B. **Avaliação da sensibilidade de *Alternaria alternata*, agente causal da mancha marrom em tangerina, a fungicidas inibidores da succinato desidrogenase**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2022.

RIBEIRO, M. C. V. *et al.* Óleos essenciais no controle do oídio em pimentão. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA HORTALIÇAS, 3., 2013, Brasília. Anais Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013.

SALGADO, A. P. S. *et al.* Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas 56 de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência Agrotécologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p.249-254, 2003.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slowmildwing in knox wheat. **Phytopathology**, West Lafayette, v. 67, p. 1051-1055, aug. 1977.

SIMÕES M. T. F. *et al.* Influência do tempo de destilação no rendimento, na composição química e na actividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial: os casos de *Pterospartum tridentatum* e *Laurus nobilis*. **Actas do II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais**, Associação Portuguesa de Horticultura, pp. 203-216, 2007.

SWART, S.H. *et al.* Chemical control of *Alternaria brown spot* on *Minneola tangelo* in South Africa. **Annals of Applied Biology**, v.133, p.17-30, 1998.

SILVA, P. R.; FRANCISCO, V. L. F. S.; BAPTISTELLA, C. S. L. Caracterização da cultura do limão no Estado de São Paulo, 2001-2007. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 38, n. 7, 2008.

SILVA, A. D. *et al.* Efeito invitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolado do maracujazeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, edição especial, p.1853-1860, 2008.

SILVA-SANTOS, A. *et al.* A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, p. 8-13, 2006.

STUART, R. M. *et al.* *Alternaria brown spot*. **Citrus Research & Technology**, v. 30, n. 1-2, p. 29-44, 2009.

TARALLO, M. M. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Alternaria alternata* EM RESPOSTA AO EXTRATO DE TANGOR MURCOTT ([*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis* (L.) Osbeck]). Tese de Doutorado. Centro de Citricultura Sylvio Moreira, 2018.

TEIXEIRA J.P.F., MARQUES M.O.N.M. e PIO, R.M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v.35, n.1, p.1- 10, 2014.

TIMMER, L.W. *et al.* *Alternaria* diseases of citrus-novel pathosystems. **Phytopathologia Mediterranea**, v.42, p.99-112, 2003.

TUNDIS, R. *et al.* Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. **Journal of Food Science**, Calabria, v. 71, n. 1, p. 40 - 46, 2012.

VEGA, B.; DEWDNEY, M. M. Distribution of QoI resistance in populations of tangerineinfecting *Alternaria alternata* in Florida. **Plant Disease**, v. 98, n. 1, p. 67-76, 2014.

VEIGA, J. C. *et al.* Refrigeração e cera na conservação pós-colheita da tangerina IAC 2019 Maria. **Citrus Research & Technology**, v. 40, p. 1-9, 2019.